

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 <b>C08L 5/08, 1/26, C08B 37/08, A61L 27/20, 15/64</b>	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO00/49084</b>  (43) 国際公開日 2000年8月24日(24.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00946		新井一彦(ARAI, Kazuhiko)[JP/JP] 〒950-0151 新潟県中蒲原郡亀田町四ツ輿野3-1
(22) 国際出願日 2000年2月18日(18.02.00)		ホーユウパレス新潟亀田605 Niigata, (JP)
(30) 優先権データ 特願平11/42371 特願平11/318579	1999年2月19日(19.02.99) 1999年11月9日(09.11.99)	JP JP
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 電気化学工業株式会社 (DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒100-8455 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 橋本正道(HASHIMOTO, Masamichi)[JP/JP] 梅田俊彦(UMEDA, Toshihiko)[JP/JP] 宮田喜明(MIYATA, Yoshiaki)[JP/JP] 山本 修(YAMAMOTO, Osamu)[JP/JP] 姫田康一(HIMEDA, Yasukazu)[JP/JP] 〒194-8560 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: HYALURONIC ACID GEL COMPOSITION, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND MEDICAL MATERIAL CONTAINING THE SAME		
(54)発明の名称 ヒアルロン酸ゲル組成物とその製造方法及びそれを含有する医用材料		
(57) Abstract A hyaluronic acid gel composition characterized by comprising hyaluronic acid and a polymer, having undergone substantially no modification with a chemical crosslinking agent or chemical modifying agent, and having a percentage dissolution of hyaluronic acid of 50% or lower when immersed in a 37°C neutral aqueous solution for 12 hours.		

(57)要約

ヒアルロン酸と高分子化合物からなり、実質的には化学的架橋剤又は化学的修飾剤によって改質されておらず、中性の37℃の水溶液中で12時間でのヒアルロン酸溶解率が50%以下であることを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	K Z	カザフスタン	R U	ロシア
A G	アンティグア・バーブーダ	D Z	アルジェリア	L C	セントルシア	S D	スードン
A L	アルバニア	E E	エストニア	L I	リヒテンシュタイン	S E	スウェーデン
A M	アルメニア	E S	スペイン	L K	シリ・ランカ	S G	シンガポール
A T	オーストリア	F I	フィンランド	L R	リベリア	S I	スロヴェニア
A U	オーストラリア	F R	フランス	L S	レソト	S K	スロヴァキア
A Z	オゼルバイジャン	G A	ガボン	L T	リトアニア	S L	シェラ・レオネ
B A	ボスニア・ヘルツェゴビナ	G B	英国	L U	ルクセンブルグ	S N	セネガル
B B	バルバドス	G D	グレナダ	L V	ラトヴィア	S Z	スワジランド
B E	ベルギー	G E	グルジア	M A	モロッコ	T D	チャード
B F	ブルガリア	G H	ガーナ	M C	モナコ	T G	トーゴー
B G	ブルガリア	G M	ガンビア	M D	モルドヴァ	T J	タジキスタン
B J	ベナン	G N	ギニア	M G	マダガスカル	T M	トルクメニスタン
B R	ブラジル	G R	ギリシャ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R	トルコ
B Y	ペラルーシ	G W	ギニア・ビサオ	M L	共和国	T T	トリニダッド・トバゴ
C A	カナダ	H R	クロアチア	M N	マリ	T Z	タンザニア
C F	中央アフリカ	H U	ハンガリー	M R	モンゴル	U A	ウクライナ
C G	コンゴー	I D	インドネシア	M R	モーリタニア	U G	ウガンダ
C H	イス	I E	アイルランド	M W	マラウイ	U S	米国
C I	コートジボアール	I L	イスラエル	M X	メキシコ	U Z	ウズベキスタン
C M	カメールーン	I N	インド	M Z	モザンビーク	V N	ヴェトナム
C N	中国	I S	アイスランド	N E	ニジニノヴゴロド	Y U	ユゴースラヴィア
C R	コスタ・リカ	I T	イタリア	N L	オランダ	Z A	南アフリカ共和国
C U	キューバ	J P	日本	N O	ノルウェー	Z W	ジンバブエ
C Y	キプロス	K E	ケニア	N Z	ニュージーランド		
C Z	チェコ	K G	キルギスタン	P L	ポーランド		
D E	ドイツ	K P	北朝鮮	P T	ポルトガル		
D K	デンマーク	K R	韓国	R O	ルーマニア		

## 明細書

### ヒアルロン酸ゲル組成物とその製造方法及びそれを含有する医用材料

#### 技術分野

本発明は、ヒアルロン酸と高分子化合物から成り実質的には化学的架橋剤又は化学的修飾剤によって改質されていない、新規な難水溶性のヒアルロン酸ゲル組成物、及びその製造方法に関し、更に特にそれらを利用した生体適合性の良好な医用材料に関する。

#### 背景技術

ヒアルロン酸は、 $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖で、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性を示すことが知られている。

このヒアルロン酸を医用材料として生体に適用する場合、易水溶性で生体内滞留時間が比較的短い点を改良するため多種多様なヒアルロン酸の化学修飾物が提案されてきた。さらにこれらの強度、組織接着性などの医用材料としての多様な物性面の性質を補完するため高分子を加え改質する数多くのヒアルロン酸組成物の検討が行われてきた。

例えば、ヒアルロン酸組成物を骨修復材として用いるには、関節用人工軟骨に用いる場合に比較し、より大きな強度が必要であり、また、ヒアルロン酸組成物を癒着防止材として用いるには、塞栓形成剤として用いる場合に比較し、より高い組織接着性が要求される。

従来、医用材料として有用なヒアルロン酸組成物は、例えば特表平5-508161号、特表平6-508169号のヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロースをカルボジイミド類のEDC(

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)で修飾したヒアルロン酸組成物の報告があげられる。またWO 86/00912のカルボキシ含有ポリサッカライド(ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルスター、カルボキシメチルセルロースなど)をジ及びポリ官能エポキシド類のB D D E (1, 4-ブタジオールグリシンエーテル)等で架橋したヒアルロン酸組成物の報告があげられる。また特開昭61-164558号のヒアルロン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸、ヘパリンなどをポリ官能エポキシド類や臭化シアン、エピクロルヒドリン等で架橋したヒアルロン酸組成物の報告があげられる。また特開昭61-138601号のヒアルロン酸ナトリウムや各種の高分子化合物をジビニルスルホンで架橋したヒアルロン酸組成物の報告があげられる。また特開平6-73102号、特開平8-301903号のヒアルロン酸ナトリウムや各種の高分子化合物を桂皮酸で架橋したヒアルロン酸組成物の報告があげられる。

しかし、これらは製造において架橋剤等を完全に除去、精製することが非常に難しいだけでなく、ヒアルロン酸及び高分子化合物の分子に架橋化合物を内包し、その生理作用や生体適合性、安全性が本質的にヒアルロン酸及び高分子化合物と同等であるとは言い難い。

ヒアルロン酸及び高分子物質自体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、何ら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、生体適合性医用材料として使用可能な、生体内滞留時間が長いヒアルロン酸組成物は未だ開発されていなかった。

本発明者らは、上記目的を達成するためにヒアルロン酸のみからなる生体適合性や成形性に優れた生体内分解性を有する化学的架橋剤や化学的修飾剤を用いないヒアルロン酸ゲル(PCT/JP98/03536)自体の物理化学的性質を鋭意検討した。

更に、ヒアルロン酸と高分子化合物からなり、実質的には化学的架橋剤又は化学的修飾剤によって改質されていないヒアルロン酸ゲル組成物が、ヒアルロン酸ゲルの本来有する強度、接着性、粘度、弾性などの性質を補完し、ヒアルロン酸ゲル単独では満足し難い医用材料の要求物性にも応ずることができ、かつ簡便に調製でき、医用材料として理想的な生体適合性、貯留性を有することを見出し、本発明に至った。

特に、このヒアルロン酸ゲル組成物の高分子化合物としてカルボキシメチルセルロースを用いた場合、特に癒着防止材、創傷被覆材として好適である。

## 発明の開示

即ち、本発明は、(1) ヒアルロン酸と高分子化合物からなり、実質的には化学的架橋剤又は化学的修飾剤によって改質されておらず、中性の37℃の水溶液中で12時間でのヒアルロン酸溶解率が50%以下であることを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物、(2) 高分子化合物がカルボキシメチルセルロースであることを特徴とする(1)記載のヒアルロン酸ゲル組成物、(3) ヒアルロン酸及び高分子化合物を含有するpH3.5以下の水溶液又は分散液を凍結し、次いで解凍してヒアルロン酸ゲル組成物を形成することを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法、(4) ヒアルロン酸を含有するpH3.5以下の水溶液を凍結し、次いで解凍して形成されるヒアルロン酸ゲルと、高分子化合物又は高分子化合物ゲルとを混合してヒアルロン酸ゲル組成物を形成することを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法、(5) 高分子化合物が多糖類、蛋白質、核酸類、及び合成高分子類からなる群から選択した1種以上であることを特徴とする(3)又は(4)記載のヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法、(6) 高分

子化合物がカルボキシメチルセルロースであることを特徴とする（3）<sup>4</sup>又は（4）記載のヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法、（7）（1）又は（2）記載のヒアルロン酸ゲル組成物を含有することを特徴とする医用材料、（8）ヒアルロン酸ゲル組成物にガンマ線、電子線、プラズマ、又はE O Gからなる群より選択した一種を照射又は注入することにより得られるヒアルロン酸ゲル組成物を含有することを特徴とする医用材料、（9）医用材料が癒着防止材であることを特徴とする（7）記載の医用材料、（10）医用材料が創傷被覆材であることを特徴とする（7）記載の医用材料である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する

本発明にいう改質とは、本来、水溶性であるヒアルロン酸或いは高分子化合物を難溶化するために架橋や化学的修飾をすることを意味する。

本発明のヒアルロン酸ゲル組成物は、ヒアルロン酸及び高分子化合物を含有するpH3.5以下の水溶液又は分散液を凍結し、次いで解凍し、中和、洗浄、乾燥することにより得られる。

また本発明のヒアルロン酸ゲル組成物は、ヒアルロン酸を含有するpH3.5以下の水溶液を凍結し次いで解凍して得られるヒアルロン酸ゲルを破碎し、高分子化合物ゲルとを水などの水溶液に投入し破碎、分散させ、これを乾燥することにより得られる。

これらのヒアルロン酸ゲル組成物は、ヒアルロン酸ゲル単独の場合よりも機械的強度及び組織接着性を簡単に向上できる。

ヒアルロン酸及び高分子化合物の水溶液のpHを調整するために使用する酸は、pH3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強

酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を<sup>5</sup>使用することが望ましい。

凍結、解凍はヒアルロン酸および高分子化合物の調整された酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量によりヒアルロン酸の酸性水溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。

凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは-5℃以下の凍結温度、5℃以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

ヒアルロン酸および高分子化合物の調整された酸性水溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用するヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、水溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成するヒアルロン酸ゲル組成物の強さ等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。

また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

ヒアルロン酸ゲル組成物の成形加工等の処理は、作製時には、ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結時の容器や手法の選択によりシート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、纖維状、流動状及びチューブ状の所望の形態のヒアルロン酸ゲル組成物の作製が可能である。

例えばシート状のヒアルロン酸ゲル組成物は、ヒアルロン酸組成物及びその分散液を底の平らな容器に入れ凍結乾燥することにより得られる。

またフィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物は、ヒアルロン酸組成物及びその分散液を底の平らな容器に入れ風乾することにより得られる

。

本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものでも、また、発酵法で製造したものでもその起源を問うことなく使用できる。

本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5$ ～約 $1 \times 10^7$ ダルトンの範囲内のものが好ましい。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等をして得たものでも同様に好ましく使用できる。

なお、本発明にいうヒアルロン酸は、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

本発明に用いられる高分子化合物は、天然高分子化合物、合成高分子化合物を問わず、本発明のヒアルロン酸ゲル組成物が生成できうる如何なる高分子化合物でも、さらにヒアルロン酸ゲル単独では満足し難い医用材料の要求物性に対して、そのヒアルロン酸ゲルの本来有する性質を補完できるものであれば如何なる高分子化合物でも使用することができる。

従って、高分子化合物同士、或いは高分子化合物とヒアルロン酸ゲルとの間の架橋の生成に関わらず、ヒアルロン酸ゲル中に取り込まれ本発明のヒアルロン酸ゲル組成物が生成しうる全ての高分子化合物を本発明に用いることができる。

本発明に用いられる高分子化合物の代表例としては、多糖類、蛋白質、核酸類、及び合成高分子類からなる群から選択されるがこれにより何ら制限されないものである。

多糖類の例としては、グリコサミノグリカン類（ヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸等）、コンドロイチン硫酸塩（コンドロイチニ-6-硫酸等）、ケラチン硫酸塩、ヘパリン、ヘパラン硫酸塩、アルギン酸及びその生物学的に受容な塩、セルロース、キチン、キトサ

ン、デキストラン、澱粉、アミロース<sup>7</sup>、ポリ乳酸、カラギーナン等が挙げられる。

また、多糖類の合成的誘導体としては、例えばカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、種々のアルキルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシキセルロース及び酸化澱粉酸化再生セルロース等が挙げられる。

また、蛋白質の例としては、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、エラスチン、種々のグロブリン、カゼイン、グルテン等、及びそれらの生物学的に受容な合成誘導体等が挙げられる。

また、合成高分子化合物の例としては、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリグルコール酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、それらのコポリマー、及びアクリル酸もしくはメタクリル酸ポリ（ヒドロキシエチル）エステル、ポリアクリルアミド等、ポリビニルアルコール、マレイン酸やスマール酸のコポリマー等のような誘導体等が挙げられる。

なお、本発明は、これらの高分子化合物に何ら制限されないものである。

本発明に用いられるヒアルロン酸及び高分子化合物を含有する pH 3.5 以下の水溶液又は分散液は、ヒアルロン酸及び高分子化合物と水を混合し、攪拌して得られる。このヒアルロン酸及び高分子化合物の濃度は各々 5.0 質量 % 以下が水溶液又は分散液の取り扱い上好都合である。

特に分子量が  $2 \times 10^6$  ダルトン以上のヒアルロン酸を使用する場合は、ヒアルロン酸の濃度は 2.5 質量 % 以下が好ましい。

また、ヒアルロン酸と高分子化合物を含有する pH 3.5 以下の水溶液又は分散液の配合比は、この液を凍結・解凍することによりヒアルロン酸ゲル組成物が得られるものであれば特に限定されない。例え

ば、癒着防止材としての配合比は、 $50 : 1 \sim 1 : 20$  が好ましい。

また、本発明では、あらかじめ、ヒアルロン酸ゲルと高分子化合物ゲルを別々に作製し、それらを破碎することにより得られるヒアルロン酸ゲル破碎物と高分子化合物ゲル破碎物を混合してヒアルロン酸ゲル組成物として用いてもよい。

本発明に用いられるヒアルロン酸のゲルと高分子化合物ゲルを混合する割合は、水などの水溶液に投入し破碎、分散できるのであれば、特に限定されない。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲル組成物は、一般の生体内分解性医用材料及びヒアルロン酸が用いられる分野であれば特に制限なく使用することができる。例えば、癒着防止材、関節用人工軟骨、薬理活性化合物の担体、創傷被覆材、人工皮膚、組織置換型生体組織修復材、関節注入剤、外科手術用縫合糸、止血剤、人工臓器、人工細胞外マトリックス又は人工基底膜、診断・治療に用いる医療器具・医療用具等の生物医学的製品又は医薬組成物への使用が挙げられる。

なお、ヒアルロン酸ゲルと高分子化合物ゲルを混合する際に生理活性物質を混合することにより、生理活性物質を包含したヒアルロン酸ゲル組成物を得ることも可能である。

次に、本発明のヒアルロン酸ゲル組成物を照射処理した医用材料について説明する。ヒアルロン酸ゲル組成物に照射するガンマ線は、コバルト 60 またはセシウム 137 を放射線源とするのが好ましい。ヒアルロン酸ゲル組成物の乾燥品に好ましくは、線量 30 kGy 以下のガンマ線を照射すると癒着防止材、創傷治療材に効果的なヒアルロン酸ゲル組成物が得られる。また、照射量、照射時間を変えることにより、ヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性を制御し、生体材料としての用途における適切な生体貯留性を制御することが可能である。ヒアルロン酸ゲル組成物にガンマ線を照射することにより、滅菌効果も

期待される。

ヒアルロン酸ゲル組成物に照射する電子線は、電子線加速器により発生させる。ヒアルロン酸ゲル組成物の乾燥品に好ましくは、線量 30 kGy 以下の電子線を照射すると癒着防止材、創傷被覆材に効果的なヒアルロン酸ゲル組成物が得られる。

プラズマは、固体、液体および気体とは区別され得る、物質の第4の状態と表現され、非常な高温または強力な電界もしくは磁界の働きを通じて形成し、通常はイオン、電子および中性核種から成る。ガス流に電力を働かせることによりイオン化されたガスはグロー放射としても知られている。

ヒアルロン酸ゲル組成物に照射するプラズマは水素、酸素、不活性キャリア・ガスの混合物を電磁界に暴露し形成される低温ガス・プラズマ等が用いられる。

ヒアルロン酸ゲル組成物の乾燥品をプラズマ発生器チャンバー内に入れ、アルゴン、酸素、水素からなるプラズマ発生ガスを注入、拡散し、プラズマ霧囲気下に 10 分以上照射すると癒着防止材、創傷被覆材に効果的ないヒアルロン酸ゲル組成物が得られる。

EOG は、通常、乾燥滅菌、蒸気滅菌が不可能な物質に対して行われる酸化エチレンガスを用いた滅菌法である。ヒアルロン酸ゲル組成物の乾燥品を EOG 滅菌チャンバー内に入れ、EOG を注入し、温度条件は好ましくは 50 °C 以下で滅菌すると、癒着防止材、創傷被覆材に効果的である。

EOG を注入する温度、時間を変えることにより、ヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性を制御し、生体材料としての用途における適切な生体貯留性を制御することが可能である。

次に、本発明の医用材料のうち癒着防止材について説明する。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材は、シート

状、フィルム状、破碎状、<sup>10</sup>スponジ状、塊状、纖維状、流動状又はチューブ状等の形態で外科手術に用いられる。用いられる形態としては、フィルム状又はシート状として外科手術部位に直接貼付するのが好ましい。または、微細破碎状、流動状として注射器で外科手術部位に塗布するのが好ましい。または、腹腔鏡の手術にも使用可能である。

さらに、ヒアルロン酸ゲル組成物の調整された酸性溶液に生理活性化合物を混合した後に凍結、解凍を行うことにより、生理活性化合物を包含したヒアルロン酸ゲル組成物を癒着防止材として得ることも可能である。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材の投与時期は、術後の癒着を防止できるどの時期でも良く、手術中又は手術終了時に投与できるが、特に手術終了の直前に投与するのが好ましい。

### 実施例

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

#### 実施例 1

分子量が $2 \times 10^6$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬製）を蒸留水にそれぞれ0.5質量%になるように溶解した。調整された水溶液のpHを、1mol/Lの塩酸でpH 1.5に調整した。酸性水溶液15mlを30mlのガラスビンに入れ、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。5日間放置した後、25°Cで解凍した。その結果、スponジ状のヒアルロン酸ゲル組成物が得られた。

#### 実施例 2

分子量が $2 \times 10^6$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムとポリビニ

ルアルコール（重合度 1 5 0 0、和光純薬製）を蒸留水にそれぞれ 0 . 5 質量%、10 質量%になるように溶解した。調整された水溶液の pH を、1 mol / l 塩酸で pH 1.5 に調整した。酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、25 °C で解凍した。その結果、ブロック状のヒアルロン酸ゲル組成物が得られた。

### 実施例 3

分子量が  $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムとアルギン酸ナトリウム（フナコシ社製）を蒸留水にそれぞれ 0.5 質量%になるように溶解した。調整された水溶液の pH を、1 mol / l 塩酸で pH 1.5 に調整した。酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、25 °C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物が得られた。

### 比較例 1

実施例 1 に於いて、混合水溶液の pH を調整せず中性のままで凍結し、解凍することを 8 回繰り返した。その結果、ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。9 回目の凍結後、凍結乾燥を行いスポンジ状のヒアルロン酸組成物を得た。

### 比較例 2

実施例 2 に於いて、混合水溶液の pH を調整せず中性のままで凍結し、解凍することを 8 回繰り返した。その結果、ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。9 回目の凍結後、凍結乾燥を行いスポンジ状のヒアルロン酸組成物を得た。

### 比較例 3

実施例 3 に於いて、混合水溶液の pH を調整せず中性のままで凍結し、解凍することを 8 回繰り返した。その結果、ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。9 回目の凍結後、凍結乾燥を行いスポンジ状のヒアルロン酸組成物を得た。

### 参考例 1

分子量が  $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に 1.0 質量 % になるように溶解した。調整された水溶液の pH を、 1 mol / l 塩酸で pH 1.5 に調整した。酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、 -20 °C に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、 25 °C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

### 実施例 4

#### ヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性試験

生理的食塩水に 50 mmol / l 濃度でリン酸緩衝成分を加え、 pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例 1 ~ 3 で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物、及び参考例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で 150 mg のヒアルロン酸を含む得られたヒアルロン酸ゲル組成物に対して、 50 ml のリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸ゲル組成物をリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。また上記の比較例 1 ~ 3 で得られた乾燥重量で 150 mg のヒアルロン酸を含む凍結乾燥されたスポンジ状のヒアルロン酸組成物は、これに対して、 50 ml のリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸組成物をリ

ン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。<sup>13</sup>

そして、ヒアルロン酸ゲル組成物及びヒアルロン酸組成物の溶解性を目視により求めた。また25℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

従って、中性の25℃の水溶液中でのヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性は、上記試験により規定されるものである。

#### ヒアルロン酸濃度の測定

リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸は、GPCを使い測定した。ヒアルロン酸は高分子量であるため先に溶出し、低分子のカルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコールはその後から溶出してくる。ヒアルロン酸の濃度は、この溶出してくるヒアルロン酸のピークを示差屈折率検出器によりピーク面積から求めた。

上記に従い、具体的に実施例1～3のヒアルロン酸ゲル組成物及び参考例1のヒアルロン酸ゲル、比較例1～3のヒアルロン酸組成物の溶解性試験を行った。その結果を表1に示す。

表 1

実験 No	ヒアルロン酸溶解率 (%)			備考
	1 日	4 日	10 日	
1	2	4	6	実施例 1
2	0	1	3	実施例 2
3	3	5	10	実施例 3
4	100	100	100	比較例 1
5	100	100	100	比較例 2
6	100	100	100	比較例 3
7	3	5	10	参考例 1

表 1 より、例えば、実験 No. 1 の実施例 1 で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率を調べると、ヒアルロン酸は 1 日経過後では、2 % の溶解率であり、4 日経過後では 4 % の溶解率であり、更に 10 日経過後では 6 % の溶解率であった。即ち、10 日経過してもヒアルロン酸は 94 % のヒアルロン酸ゲルが残存していた。スポンジ状の形態も保持されていた。

実験 No. 7 の参考例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率を調べると、1 日経過後では、3 % の溶解率であり、4 日経過後では 5 % の溶解率であり、更に 10 日経過後では 10 % の溶解率であった。即

ち、実施例 1～3 で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率は、参考例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率と同様であることが見出される。

それに対して、実験 N o. 4～6 の比較例 1～3 で得られたヒアルロン酸組成物の溶解率を調べると、1 日経過後では、100% の溶解率であり、完全に溶解した。

### 実施例 5

#### ヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性試験

生理的食塩水に 50 m m o l / l 濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例 1～3 で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物、及び参考例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で 20 mg のヒアルロン酸を含む得られたヒアルロン酸ゲル組成物に対して、50 ml のリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸ゲル組成物をリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。また上記の比較例 1～3 で得られた乾燥重量で 20 mg のヒアルロン酸を含む凍結乾燥されたスポンジ状のヒアルロン酸組成物は、これに対して、50 ml のリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸組成物をリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

そして、37°Cで攪拌下のリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

従って、中性の37°Cの水溶液中でのヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性は、上記試験により規定されるものである。

上記に従い、具体的に実施例 1～3 のヒアルロン酸ゲル組成物及び参考例 1 のヒアルロン酸ゲル、比較例 1～3 のヒアルロン酸組成物の

溶解性試験を行った。その結果を表<sup>16</sup>2に示す。

表 2

実験 No	ヒアルロン酸溶解率 (%)			備考
	6 時間後	12 時間後	24 時間後	
8	12	14	18	実施例 1
9	10	16	23	実施例 2
10	13	15	20	実施例 3
11	100	100	100	比較例 1
12	100	100	100	比較例 2
13	100	100	100	比較例 3
14	12	15	20	参考例 1

表 2 より、例えば、実験 N o. 8 の実施例 1 で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率を調べると、ヒアルロン酸は 6 時間経過後では、12% の溶解率であり、12 時間経過後では 14% の溶解率であり、更に 24 時間経過後では 18% の溶解率であった。即ち、24 時間経過してもヒアルロン酸は 82% のヒアルロン酸ゲルが残存していた。

実験 N o. 14 の参考例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率を調べると、6 時間経過後では、12% の溶解率であり、12 時間経過後では 15% の溶解率であり、更に 24 時間経過後では 20% の溶解

率であった。即ち、実施例 1～3<sup>17</sup>で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率は、参考例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率と同様であることが見出される。

それに対して、実験 N o. 10～12 の比較例 1～3 で得られたヒアルロン酸組成物の溶解率を調べると、6 時間経過後では、100% の溶解率であり、完全に溶解した。

### 実施例 6

分子量が  $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムとキトサン（和光純薬製）を蒸留水にそれぞれ 1.0 質量%、0.1 質量% に混ぜ、pH を、1 mol/l 塩酸で pH 1.5 に調整した。酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、-20°C に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、25°C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物が得られた。

### 実施例 7

#### ヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性試験

生理的食塩水に 100 mmol/l 濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例 1、2、及び 6 で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物を蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で 20 mg のヒアルロン酸を含む得られたヒアルロン酸ゲル組成物に対して、100 ml のリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸ゲル組成物をリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

25°C でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、及びキトサンの割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中の各成分の濃度から求めた。

ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、及びキトサン濃度の測定

リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、及びキトサンは、G P C を使い測定した。ヒアルロン酸は高分子量であるため G P C により先に溶出し、低分子のカルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、及びキトサンはその後から溶出してくる。ヒアルロン酸の濃度は、この溶出してくるヒアルロン酸のピークを示差屈折率検出器によりピーク面積から求めた。

上記に従い、具体的に実施例 1、2、及び 6 のヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性試験を行った。その結果を表 3 に示す。

表 3

実験 No	成分	ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、 ポリビニルアルコール、キトサン溶解率 (%)			備考
		1 日後	4 日後	10 日後	
15	HA	2	4	6	実施例 1
	CMC	10	30	51	
16	HA	0	1	3	実施例 2
	PVA	0	1	1	
17	HA	1	4	5	実施例 6
	キトサン	4	5	6	

表3より、例えば、実験No. 1<sup>19</sup>の実施例1で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率を調べると、ヒアルロン酸は1日経過後では、2%の溶解率であり、4日経過後では4%の溶解率であり、更に10日経過後では6%の溶解率であった。また、カルボキシメチルセルロースは1日経過後では、10%の溶解率であり、4日経過後では30%の溶解率であり、更に10日経過後では51%の溶解率であった。

実験No. 16の実施例2で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率を調べると、ヒアルロン酸は1日経過後では、0%の溶解率であり、4日経過後では1%の溶解率であり、更に10日経過後では3%の溶解率であった。また、ポリビニルアルコールは1日経過後では、0%の溶解率であり、4日経過後では1%の溶解率であり、更に10日経過後では1%の溶解率であった。

実験No. 17の実施例6で得られたヒアルロン酸ゲル組成物の溶解率を調べると、ヒアルロン酸は1日経過後では、1%の溶解率であり、4日経過後では4%の溶解率であり、更に10日経過後では5%の溶解率であった。また、キトサンは1日経過後では、4%の溶解率であり、4日経過後では5%の溶解率であり、更に10日経過後では6%の溶解率であった。

## 実施例8

### ヒアルロン酸ゲル組成物の細胞毒性試験

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞培養において本発明で得られたヒアルロン酸ゲル組成物を非接触下で共存させ、細胞増殖挙動の観察によりその細胞毒性を評価した。実施例1の方法で作製したスポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物をリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬したのち凍結乾燥体とした。その凍結乾燥体を機械的に粉碎したもの20mgをフ

アルコン社製のセルカルチャーインサート<sup>20</sup>（ポアサイズ：3 μm）中に入れ、細胞を播種した培地に浸した。また、ヒアルロン酸ゲル組成物非共存下での培養をコントロールとした。

培養条件 プレート：細胞培養用 12 ウエルプレート

培地：D M E M 培地 + 10 % ウシ胎児血清， 2 m l  
／ウェル

温度：37 °C (5 % C O<sub>2</sub> 下)

播種細胞数：1 × 10<sup>4</sup> 個／ウェル

培養開始後 2 日、 5 日、 8 日後に、細胞密度を倒立顕微鏡を用いて観察したところ、ヒアルロン酸ゲル組成物が共存していてもコントロールと同様に良好な増殖を示し、本発明で得られたヒアルロン酸ゲル組成物には細胞毒性作用がないことが確認された。

#### 実施例 9

分子量が2 × 10<sup>6</sup> ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬製）を蒸留水にそれぞれ0.5 質量% になるように溶解した。この水溶液のpHを、1 mol/l 1 塩酸でpH 1.5 に調整しヒアルロン酸酸性水溶液を得た。このヒアルロン酸酸性水溶液 25 m l を、プラスチック製シャーレに入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。5日間凍結してスポンジ状のヒアルロン酸ゲル組成物が得られた。次にこれを生理的食塩水に 50 mM 濃度でリン酸緩衝成分を加えて調整したpH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水 100 m l に 5 °C で 24 時間浸漬し中和した後、蒸留水で十分に洗浄した。そしてこれを凍結乾燥した。その結果、シート状のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材を得た。

### 実施例 10

分子量が $2 \times 10^6$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを0.5質量%になるように溶解した。調整された水溶液のpHを、1 mol/l 1 塩酸で pH 1.5 に調整した。酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、25 °C で解凍し、得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを、マイクロホモジナイザー (Polytoron, Kinematica AG 製) にて粉碎し破碎状のヒアルロン酸ゲルを得た。

25 °C での 1 % 粘度が 150 ~ 250 mPa · s のカルボキシメチルセルロースナトリウム (エーテル化度 0.62 ~ 0.68、換算分子量  $1.28 \times 10^5$  ~  $1.35 \times 10^5$  ダルトン、第一工業製薬製) を蒸留水に 0.5ないし 1 質量%になるように溶解した。こうして調製された水溶液の pH を 1 mol/l 1 硝酸で 1.0 に調整し、酸性水溶液 15 ml を 30 ml の容器に入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。3 日間放置した後、25 °C で解凍し、得られたスポンジ状のカルボキシメチルセルロースゲルを、マイクロホモジナイザー (Polytoron, Kinematica AG 製) にて粉碎し、破碎状のカルボキシメチルセルロースゲルを得た。

得られた破碎状のヒアルロン酸ゲルとカルボキシメチルセルロースナトリウムゲルを蒸留水に各々 10.0 質量%になるように投入し、攪拌してスラリー溶液を得た。このスラリー溶液を 25 ml を、9 cm 角のプラスチック製シャーレに入れ自然乾燥した。その結果、フィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材を得た。

### 比較例 4

実施例 9 に於いて、混合水溶液の pH を調整せず中性のままで凍結

し、解凍することを 8 回繰り返した。<sup>22</sup> その結果、ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。この溶液をプラスチック製シャーレに入れて 9 回目の凍結を行い、凍結乾燥してシート状のヒアルロン酸組成物の癒着防止材を得た。

### 比較例 5

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1. 1 g を 30 g の水に溶解し 2 %  $\text{NaOH}$  で pH 1.0 に調整した溶液に平均分子量 60 万のヒアルロン酸ナトリウム 0. 3 g とカルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬製）を蒸留水にそれぞれ 0. 3 g を溶解した。塩化シアヌール 0. 05 g を 1. 5 ml のジオキサンに溶解し、上記ヒアルロン酸溶液に添加し 3 時間室温で反応した。その後、透析膜に入れ、1 日間水に対して透析し、その溶液 1.5 ml をプラスチック製シャーレに入れ凍結乾燥して、シート状の塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物の癒着防止材を得た。

### 実施例 11

ヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材のマウス子宮モデルによる癒着防止効果試験

実施例 9 と 10 で得られたシート状及びフィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材を、1 cm × 2 cm の長方形に裁断したもの、コントロールとして、比較例 4 で得られたシート状ヒアルロン酸組成物を 1 cm × 2 cm の長方形に裁断したもの、及び比較例 5 で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物を 1 cm × 2 cm の長方形に裁断したものを以下の試験に供した。

7 週令雌 ICR マウス（体重 25 ~ 30 g）を腹腔内ペントバルビタール注射で麻酔後正中切開にて開腹し、子宮角に約 10 mm の長さ

でヨードチンキ擦過塗布により損傷<sup>23</sup>を加えた。各群 10 匹のマウスにコントロールとして無処置及び、それぞれ上記の実施例 9 及び 10 のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材、比較例 4 のヒアルロン酸組成物の癒着防止材、比較例 5 の塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物の癒着防止材の 1 cm × 2 cm の長方形のシートを損傷部位に巻き付けた。そしていづれの場合も 5-0 デキソンにて閉腹した。

術後 10 日目に、無処置、ヒアルロン酸ゲル組成物及び、ヒアルロン酸組成物塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物を投与したマウスを各 10 匹を頸椎脱臼致死後、腹部を再開腹し、癒着形成の有無を判定した。癒着形成は、膜状のごく軽度の癒着は癒着と判定せず、纖維状で厚く、ピンセットで引っぱても容易に引き剥がれない強い癒着を生じた場合を癒着と判定した。その結果を表 4 に示す。

表 4

実験 No	群	癒着の割合	組織の状態	備考
18	実施例 9 のヒアルロン酸 ゲル組成物	0 / 10	異常無し	実施例
19	実施例 10 のヒアルロン酸 ゲル組成物	0 / 10	異常無し	実施例
20	比較例 4 のヒアルロン酸 組成物	5 / 10	異常無し	比較例
21	無処置 (生理的食塩水)	9 / 10	異常無し	比較例
22	比較例 5 のヒアルロン酸 組成物	3 / 10	軽微な炎症	比較例

表 4 より、無処置で癒着の形成割合が 10 匹中 9 匹の時、単にヒア

<sup>24</sup> ルロン酸混合液を中性で凍結して得たヒアルロン酸組成物が、10匹中5匹、及び塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物が10匹中3匹なのに比較して、実施例9及び10のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材は10匹中0匹、と優れた癒着防止作用があることが示唆された。

どのマウスも正常に生育したが、組織の状態は実施例9と10のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材及び比較例4のヒアルロン酸組成物の癒着防止材が埋め込み局所の組織の状態に異常は見られなかったのに対し、比較例5で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物では組織の軽微な炎症が認められた。

### 実施例12

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量 $2 \times 10^5$ ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1mol/l/1硝酸で1.5に調製した。一方、25℃での1%粘度が150～250mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62～0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ ～ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1mol/l/1硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で50：1になるように混合し、混合液100mlを容器（面積：16cm×16cm）に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25℃で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回100mmol/l/1のリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを室温で風乾することによりHA/CMCゲルフィルムを得た。

### 実施例 1 3

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量 $2 \times 10^5$ ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1N硝酸で1.5に調製した。一方、25°Cでの1%粘度が150～250 mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62～0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ ～ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で2：1になるように混合し、混合液100mlを容器（面積：16cm×16cm）に入れ、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25°Cで解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回100mmol/lのリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを室温で風乾することによりHA/CMCゲルフィルムを得た。

### 実施例 1 4

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量 $2 \times 10^5$ ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調製した。一方、25°Cでの1%粘度が150～250 mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62～0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ ～ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で1：1になるように混合し、混合液10

0 m l を容器（面積：16 cm × 16 cm）に入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25 °C で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回 100 mmol/l のリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを室温で風乾することにより H A / C M C ゲルフィルムを得た。

### 実施例 1 5

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量  $2 \times 10^5$  ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液の pH を 1 mol/l / 1 硝酸で 1.5 に調製した。一方、25 °C での 1 % 粘度が 150 ~ 250 MPa · s のカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度 0.62 ~ 0.68、換算分子量  $1.28 \times 10^5$  ~  $1.35 \times 10^5$  ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液の pH を 1 mol/l / 1 硝酸で 1.5 に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で 1 : 2 になるように混合し、混合液 100 m l を容器（面積：16 cm × 16 cm）に入れ、-20 °C に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25 °C で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回 100 mmol/l のリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを室温で風乾することにより H A / C M C ゲルフィルムを得た。

### 実施例 1 6

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量  $2 \times 10^5$  ダルトン）を蒸留水に 1

質量%になるように溶解し、水溶液の<sup>27</sup>pHを1mol/l硝酸で1.5に調製した。一方、25℃での1%粘度が150~250mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62~0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ ~ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で50:1になるように混合し、混合液100mlを容器（面積：16cm×16cm）に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25℃で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回100mmol/lのリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを凍結することによりHA/CMCゲルシートを得た。

### 実施例17

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量 $2 \times 10^5$ ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調製した。一方、25℃での1%粘度が150~250mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62~0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ ~ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で2:1になるように混合し、混合液100mlを容器（面積：16cm×16cm）に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25℃で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られ

た。更に、得られたゲル組成物を<sup>28</sup> 2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回100mmol/lのリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを凍結することによりHA/C MCゲルシートを得た。

### 実施例18

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量 $2 \times 10^5$ ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調製した。一方、25℃での1%粘度が150～250mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62～0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ ～ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で1：1になるように混合し、混合液100mlを容器（面積：16cm×16cm）に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25℃で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸／カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回100mmol/lのリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを凍結することによりHA/C MCゲルシートを得た。

### 実施例19

ヒアルロン酸ナトリウム（分子量 $2 \times 10^5$ ダルトン）を蒸留水に1質量%になるように溶解し、水溶液のpHを1mol/l硝酸で1.5に調製した。一方、25℃での1%粘度が150～250mPa·sのカルボキシメチルセルロースナトリウム（エーテル化度0.62

～0.68、換算分子量 $1.28 \times 10^5$ <sup>29</sup>～ $1.35 \times 10^5$ ダルトン、第一工業製薬製)を蒸留水に1質量%になるように溶解し、こうして調製された水溶液のpHを1N硝酸で1.5に調整した。二つの酸性水溶液を容量比で1:2になるように混合し、混合液100mlを容器(面積:16cm×16cm)に入れ、-20℃に設定した冷凍庫に入れた。3日間放置した後、25℃で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸/カルボキシメチルセルロースゲル組成物が得られた。更に、得られたゲル組成物を2回蒸留水により過剰の酸溶液を置換した後、3回100mmol/lのリン酸緩衝生理食塩水による洗浄で完全中和を行った。中和後、ゲルを凍結することによりHA/CMCゲルシートを得た。

### 実施例20

#### ヒアルロン酸/カルボキシメチルセルロースゲル組成物の溶解性試験

生理的食塩水に50mmol/l濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH7.4のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例11～18で得られた乾燥重量で50mgのゲル組成物は、これに対して、50mlのリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、リン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

また37℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸とカルボキシメチルセルロースの割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

従って、中性の37℃の水溶液中のヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性は、上記試験により規定されるものである。

#### ヒアルロン酸とカルボキシメチルセルロース濃度の測定

リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸は、 $\text{NaOH}$ 溶液を添加することによりゲルを完全に分解させた後、ヒアルロン酸分解酵素処理を行った。そして、分析用サンプルは $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターによるろ過後、GPCを使い測定した。ヒアルロン酸及びカルボキシメチルセルロースの濃度は、溶出してくるヒアルロン酸のピークを示差屈折率検出器により算出したピーク面積から求めた。ヒアルロン酸は酵素分解により分子量が低下しており、高分子量のカルボキシメチルセルロースとピーク分離が可能である。

上記に従い、具体的に実施例12～19のヒアルロン酸ゲル組成物の溶解性試験を行った。その結果を表5、6に示す。

表5

## ヒアルロン酸ゲル溶解性 (pH 7)

実験 No	形状	組成	ヒアルロン酸溶解率 (%)			備考
			1日	3日	7日	
23	フィルム状	50 : 1	96	81	74	実施例12
24		2 : 1	96	90	62	実施例13
25		1 : 1	95	93	67	実施例14
26		1 : 2	97	87	68	実施例15
27	シート状	50 : 1	94	82	70	実施例16
28		2 : 1	94	86	72	実施例17
29		1 : 1	95	87	59	実施例18
30		1 : 2	97	81	65	実施例19

表 6

ヒアルロン酸ゲル溶解性 (pH 8)

実験 No	形状	組成	ヒアルロン酸溶解率 (%)			備考
			1 日	3 日	7 日	
3 1	フィルム状	5 0 : 1	7 0	4 6	2 7	実施例 1 2
3 2		2 : 1	6 4	4 2	2 2	実施例 1 3
3 3		1 : 1	7 2	5 3	2 0	実施例 1 4
3 4		1 : 2	8 3	5 0	1 9	実施例 1 5
3 5	シート状	5 0 : 1	7 2	4 4	2 0	実施例 1 6
3 6		2 : 1	6 9	4 3	2 2	実施例 1 7
3 7		1 : 1	7 3	4 9	2 5	実施例 1 8
3 8		1 : 2	7 1	4 1	2 1	実施例 1 9

表 5、6 よりいずれの組成比のゲル組成物であっても、ゲル化させることによりヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロースの両方ともが溶出しにくくなることがわかった。<sup>32</sup>

### 実施例 2 1

#### ヒアルロン酸ゲル組成物の細胞毒性試験

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞培養において本発明で得られたヒアルロン酸ゲル組成物を非接触下で共存させ、細胞増殖挙動の観察によりその細胞毒性を評価した。実施例 1 2 ~ 1 9 の方法で作製したゲル組成物を機械的に粉碎したもの 2 0 m g をファルコン社製のセルカルチャーラインサート（ポアサイズ：3 μ m）中に入れ、細胞を播種した培地に浸した。また、ヒアルロン酸ゲル組成物非共存下での培養をコントロールとした。

培養条件 プレート：細胞培養用 1 2 ウェルプレート

培地：D M E M 培地 + 1 0 % ウシ胎児血清，

2 m / ウェル

温度：3 7 °C (5 % C O<sub>2</sub> 下)

播種細胞数：1 × 1 0<sup>4</sup> 個／ウェル

培養開始後 2 日、5 日、8 日後に、細胞密度を倒立顕微鏡を用いて観察したところ、ゲル組成物が共存していてもコントロールと同様に良好な増殖を示し、本発明で得られたゲル組成物には細胞毒性作用がないことが確認された。

### 実施例 2 2

#### ラット盲腸擦過モデルにおける癒着防止試験

### 癒着誘導法

ラット（SD、メス、9週齢以上）下肢に麻酔剤を筋注し麻酔後、仰向けに固定してイソジンにて腹部皮膚を消毒後、剪毛を行った。ラット腹筋を正中線に沿って開腹し、盲腸部分にガーゼをかぶせた回転棒を押し当て擦過した。擦過部にヒアルロン酸組成物を原料として作製したフィルム状癒着防止材をあて、盲腸を元に戻して縫合を行った。また、癒着防止材を処置せず、そのまま盲腸を戻したものとコントロールとした。こうした処置はコントロールを含めた各実験で10匹づつのラットを用いた。術後一週間程度で剖検し、癒着形成の有無を判定した。癒着形成は、膜状のごく軽度の癒着は癒着と判定せず、繊維状で厚く、ピンセットで引っぱても容易に引き剥がれない強い癒着を生じた場合を癒着と判定した。その結果を表7に示す。

尚、比較例4、5、および実施例14～16で製造した組成物200mg/81cm<sup>2</sup>を試験片として、上記方法による癒着防止剤としての効果を評価した。

表 7

## ヒアルロン酸ゲル癒着防止試験

実験 No	群	癒着の割合	組織の状態	備考
3 9	無処置	9 / 1 0	異常なし	比較例
4 0	比較例 4 のヒアルロン酸組成物	7 / 1 0	異常なし	比較例
4 1	比較例 5 のヒアルロン酸組成物	4 / 1 0	軽微な炎症	比較例
4 2	実施例 1 4 のヒアルロン酸組成物	3 / 1 0	異常なし	実施例
4 3	実施例 1 5 のヒアルロン酸組成物	2 / 1 0	異常なし	実施例
4 4	実施例 1 6 のヒアルロン酸組成物	2 / 1 0	異常なし	実施例

表 7 より、無処置で癒着の形成割合が 10 匹中 9 匹の時、単にヒアルロン酸混合液を中正で凍結して得たヒアルロン酸組成物が 10 匹中 7 匹、及び塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物が 10 匹中 4 匹なのに比較して、実施例 8 のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材は 10 匹中 3 匹以下、と優れた癒着防止作用があることが示唆された。

組織の状態は実施例 1 4 ~ 1 6 のヒアルロン酸ゲル組成物の癒着防止材及び比較例 4 のヒアルロン酸組成物の癒着防止材が埋め込み局所の組織の状態に異常が見られなかったのに対し、比較例 5 で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸組成物では組織の軽微な炎症が認められた。

### 実施例 2 3

#### ゲル創傷被覆材のラット皮膚欠損モデルによる創傷治療効果試験

7週令（約200g）のウイスター（Wistar）系、雌性ラットの背部の毛を刈り、エーテル麻酔下で眼科用ハサミを用いて背部皮膚部分を直径2cmの円状に取り除き、完全皮膚欠損創を作製した。医療用不織布ガーゼ（40×40mm：2枚重ね）のみを適応した無処置群、比較例4、5、および実施例14で作製した組成物（30×30mm）を創面に被覆後、医療用不織布ガーゼ（40×40mm：2枚重ね）を適応した処置群を設定した。各群6匹のラットを用いた。医療用不織布ガーゼは粘着包帯で設定し、更にテープングで固定した。

治療効果は、創面積の経時的变化を測定することで比較した。すなわち、初期創面の面積に対する面積比を次の式によって求め、その経時的变化を調べた。

結果を表8に示す。

面積比（%）

$$= \{ (\text{観察日の創面の長径} \times \text{短径}) / (\text{初期創面の長径} \times \text{短径}) \} \times 100$$

表 8

## ヒアルロン酸ゲル創傷治癒効果試験

実験 No	実験群	面積比 (%)				
		0 日	2 日	3 日	7 日	10 日
4 5	無処置	1 0 0	9 3	8 1	7 4	6 5
4 6	比較例 4 のヒアルロン酸組成物	1 0 0	9 3	7 5	6 5	5 7
4 7	比較例 5 のヒアルロン酸組成物	1 0 0	8 9	7 4	6 0	4 9
4 8	実施例 14 のヒアルロン酸組成物	1 0 0	8 6	7 4	4 5	3 5

表 8 より難水溶性となったヒアルロン酸ゲルシートが創傷治療効果を増強することがわかった。

## 実施例 24

分子量が  $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを 0.5 質量% になるように溶解した。調整された水溶液の pH を、 1 mol/l 塩酸で pH 1.5 に調整した。酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、 -20 °C に設定した冷凍庫に入れた。5 日間放置した後、 25 °C で解凍し、得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを、マイクロホモジナイザー (Polytoron, Kinematica AG 製) にて粉碎し破碎状のヒアルロン酸ゲルを得た。カルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬製）を蒸留水に 1.0 質量% になるように溶解した溶液に、破碎状のヒアルロン酸ゲルを 2.0 質量% になるように拡散させ、この溶液を 25 ml を、 9 cm 角のプラスチック製シャーレ

に入れ自然乾燥した。その結果、<sup>37</sup>フィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物を得た。

### 実施例 2 5

実施例 1 と同様にして破碎状のヒアルロン酸ゲルを得た。そしてポリビニルアルコール（重合度 1 5 0 0、和光純薬製）を蒸留水に 1. 0 質量% になるように溶解した溶液に、破碎状のヒアルロン酸ゲルを 2. 0 質量% になるように拡散させ、この溶液を 2 5 m l を、9 cm 角のプラスチック製シャーレに入れ自然乾燥した。その結果、フィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物を得た。

### 実施例 2 6

実施例 1 と同様にして破碎状のヒアルロン酸ゲルを得た。そしてゼラチン（フナコシ社製）を蒸留水に 1. 0 質量% になるように溶解した溶液に、破碎状のヒアルロン酸ゲルを 2. 0 質量% になるように拡散させ、この溶液を 2 5 m l を、9 cm 角のプラスチック製シャーレに入れ自然乾燥した。その結果、フィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物を得た。

### 実施例 2 7

実施例 1 と同様にして破碎状のヒアルロン酸ゲルを得た。そしてコンドロイチン硫酸（和光純薬製）を蒸留水に 1. 0 質量% になるように溶解した溶液に、破碎状のヒアルロン酸ゲルを 2. 0 質量% になるように拡散させ、この溶液 2 5 m l を、9 cm 角のプラスチック製シャーレに入れ自然乾燥した。その結果、フィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物を得た。

### 比較例 6

実施例 1 と同様にして破碎状のヒアルロン酸ゲルを得た。そして得られた破碎状のヒアルロン酸ゲルを 3.0 質量% になるように蒸留水中に拡散させ、この溶液を 25 ml を、9 cm 角のプラスチック製シャーレに入れ自然乾燥した。その結果、フィルム状のヒアルロン酸ゲルを得た。

### 実施例 2 8

#### ヒアルロン酸ゲル組成物の乾燥強度試験

上記実施例 2 4 ~ 2 7、比較例 6 のフィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物及びヒアルロン酸ゲルの乾燥引っ張り強度を島団製作所製の E Z - T E S T で測定した。各サンプルを 1 cm × 5 cm の長方形に切断し、30 mm の間隔を開けてクロスヘッドの速度 10 mm/min で引っ張り破断する時点の最大応力を測定した。

その結果を表 9 に結果を示す。実施例 2 4 ~ 2 7 のヒアルロン酸ゲル組成物のフィルムが破断する時の加重は、比較例 6 のヒアルロン酸ゲルのみのフィルムよりも大きく乾燥強度が向上していることが分かった。

表 9  
ヒアルロン酸ゲル組成物の乾燥強度

実験 N o	乾燥強度 (MPa)	備考
4 9	5 9	実施例 2 4
5 0	6 5	実施例 2 5
5 1	6 2	実施例 2 6
5 2	6 5	実施例 2 7
5 3	4 5	比較例 6

### 実施例 2 9

#### ヒアルロン酸ゲル組成物の組織接着性試験

上記実施例 2 4 ~ 2 7、比較例 6 のフィルム状のヒアルロン酸ゲル組成物及びヒアルロン酸ゲルの組織接着性を島図製作所製の E Z - T E S T で測定した。

各サンプルを 1 c m × 1 c m の正方形に切断し、クロスヘッドに装着し、組織として皮なしチキンとの剥離時の応力を測定した。各サンプルと組織を 0 . 0 1 k g / c m<sup>2</sup> の圧力で 3 0 秒間接触させた後、クロスヘッドの速度 1 m m / m i n で引っ張り剥離する時点の最大応力を測定した。

その結果を表 1 0 に結果を示す。

表 1 0

## ヒアルロン酸ゲル組成物の組織接着性

実験 N o	最大剥離加重 (N)	
5 4	2 . 0	実施例 2 4
5 5	1 . 5	実施例 2 5
5 6	1 . 7	実施例 2 6
5 7	1 . 9	実施例 2 7
5 8	0 . 9	比較例 6

表 1 0 より、実施例 2 4 ~ 2 7 のヒアルロン酸ゲル組成物のフィルムが破断する時の加重は、比較例 6 のヒアルロン酸ゲルのフィルムのそれと比較して優れていることが分かった。

## 産業上の利用の可能性

以上、本発明によれば、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、ヒアルロン酸と高分子化合物からなるヒアルロン酸ゲル組成物が簡単に調整できる。そして、このヒアルロン酸ゲル組成物は、ヒアルロン酸単独で形成されたゲルの各種物性を補完し、更に生体適合性に優れた医療分野に有用な医用材料として提供することができる。

## 請求の範囲

1. ヒアルロン酸と高分子化合物からなり、実質的には化学的架橋剤又は化学的修飾剤によって改質されておらず、中性の37℃の水溶液中で12時間でのヒアルロン酸溶解率が50%以下であることを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物。
2. 高分子化合物がカルボキシメチルセルロースであることを特徴とする請求項1記載のヒアルロン酸ゲル組成物。
3. ヒアルロン酸及び高分子化合物を含有するpH3.5以下の水溶液又は分散液を凍結し、次いで解凍してヒアルロン酸ゲル組成物を形成することを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法。
4. ヒアルロン酸を含有するpH3.5以下の水溶液を凍結し、次いで解凍して形成されるヒアルロン酸ゲルと、高分子化合物又は高分子化合物ゲルとを混合してヒアルロン酸ゲル組成物を形成することを特徴とするヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法。
5. 高分子化合物が多糖類、蛋白質、核酸類、及び合成高分子類からなる群から選択した1種以上であることを特徴とする請求項3又は4記載のヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法。
6. 高分子化合物がカルボキシメチルセルロースであることを特徴とする請求項3又は4記載のヒアルロン酸ゲル組成物の製造方法。
7. 請求項1又は2記載のヒアルロン酸ゲル組成物を含有することを特徴とする医用材料。
8. ヒアルロン酸ゲル組成物にガンマ線、電子線、プラズマ、又はE.O.Gからなる群より選択した一種を照射又は注入することにより得られるヒアルロン酸ゲル組成物を含有することを特徴とする医用材料。

9. 用材料が癒着防止材であることを特徴とする請求項 7 記載の医用  
材料。<sup>42</sup>

10. 医用材料が創傷被覆材であることを特徴とする請求項 7 記載の  
医用材料。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00946

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C08L5/08, C08L1/26, C08B37/08, A61L27/20, A61L15/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08L1/00-C08L101/16, C08B37/08, A61L15/00-A61L33/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5346935, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.,), 13 September, 1994 (13.09.94), Claims 1, 7; Column 2, line 43; Column 3, lines 29 to 35 & EP, 516026, A1 & JP, 5-230313, A	1, 2, 7
X	JP, 9-10294, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 14 January, 1997 (14.01.97), Claims 1, 5; Par.No.[0001], Column 2, lines 5 to 6; Column 3, lines 11 to 16; Column 4, lines 9 to 11 (Family: none)	1, 7, 10
X	JP, 5-58881, A (Shiseido Company, Limited. ), 09 March, 1993 (09.03.93), Claim 1; Column 1, line 27; Column 2, lines 46 to 48 (Family: none)	1, 7
A	JP, 10-290830, A (OFUTEKUSU K.K.), 04 November, 2010 (04.11.10) (Family: none)	1-7, 9, 10
A	JP, 3-215417, A (Agency of Industrial Science and Technology),	1, 7, 8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
17 May, 2000 (17.05.00)

Date of mailing of the international search report  
30.05.00

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/00946

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>20 September, 1991 (20.09.91) (Family: none)</p> <p>EP, 544259, A1 (LIGNYTE CO LTD), 02 June, 1993 (02.06.93) &amp; JP, 6-73103, A</p>	1, 3-5, 7, 9, 10

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/00946

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C08L5/08, C08L1/26, C08B37/08, A61L27/20, A61L15/64

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C08L1/00-C08L101/16, C08B37/08, A61L15/00-A61L33/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	U.S., 5346935, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 13. 9月. 1994 (13. 09. 94) 請求項1, 請求項7, 第2欄第43行, 第3欄第29-35行&EP, 516026, A1&JP, 5-230313, A	1, 2, 7
X	J.P., 9-10294, A (協和発酵工業株式会社) 14. 1月. 1997 (14. 01. 97) 請求項1, 請求項5, 段落番号【0001】，第2欄第5-6行，第3欄第11-16行，第4欄第9-11行，(ファミリーなし)	1, 7, 10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

17.05.00

## 国際調査報告の発送日

30.05.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

三谷 祥子

4 J 9739



電話番号 03-3581-1101 内線 3495

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 5-58881, A (株式会社資生堂) 09. 3月. 1993 (09. 03. 93) 請求項1, 第1欄第27行, 第2欄第46-48行, (ファミリーなし)	1, 7
A	JP, 10-290830, A (株式会社オフテクス) 4. 11月. 1998 (04. 11. 10), (ファミリーなし)	1-7, 9, 10
A	JP, 3-215417, A (工業技術院長) 20. 9月. 1991 (20. 09. 91), (ファミリーなし)	1, 7, 8
A	EP, 544259, A1 (LIGNYTE CO LTD) 2. 6月. 1993 (02. 06. 93) & JP, 6-73103, A	1, 3-5, 7, 9, 10